

El test de diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión

Diatom testing for the diagnosis of death by drowning

Nora I. Maidana

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; IBBEA (UBA-CONICET).
Ciudad Universitaria, Pab. 2, C1428EHA-Buenos Aires, Argentina

e-mail:noramaidana@gmail.com

Resumen: Las diatomeas son conocidas en el ámbito científico como valiosos indicadores ambientales y paleoambientales. En los últimos años, varios países de Europa, Asia y América del Norte las han adoptado como herramienta diagnóstica de rutina en casos de muerte por sumersión. En Sudamérica esto no ha ocurrido, fundamentalmente por la poca difusión que se le ha dado a esta práctica y esto a su vez es consecuencia directa de la escasez de especialistas. En esta contribución se aportan datos y herramientas para la utilización del conocimiento de las diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión y se presenta un protocolo para la toma de muestras de tejidos cadavéricos que debe ser comunicado a los profesionales o técnicos encargados de hacerlo a fin de evitar contaminaciones que enmascaren los resultados del análisis.

Palabras clave: Ahogamiento, ciencias forenses, diatomeas, sumersión

Abstract: Diatoms are known as valuable environmental and paleoenvironmental indicators. In recent years, several countries in Europe, Asia and North America have adopted them as a tool to assess death by drowning. In South America, this has not happened, mainly due to the low diffusion that has been given to this practice and this in turn is a direct consequence of the shortage of specialists. In this contribution data and tools are provided for use of the knowledge of the diatoms in the diagnosis of death by drowning, and a protocol for sampling cadaveric tissues for the professionals or technicians responsible for doing so is presented to avoid contaminations that may mask the analysis of results.

Key words: Diatoms, drowning, forensic sciences, submersion

1 Introducción

1.1 Las diatomeas

Las diatomeas son algas unicelulares cuyo principal rasgo distintivo son sus cubiertas celulares silíceas (frústulos), compuestas de dos piezas o tecas (Fig. 1A). Los frústulos poseen la mayoría de los caracteres necesarios para su identificación precisa [17].

Si bien Sudamérica cuenta con numerosos y diversos ambientes acuáticos, su flora de diatomeas está lejos de ser conocida en su totalidad.

Las diatomeas pueden vivir en ambientes muy diferentes, tanto en aguas dulces, como salinas y hasta hipersalinas, ya sean ácidas o alcalinas, en el hielo o en aguas termales. También se las puede encontrar fuera del agua, sobre suelo húmedo o sobre cortezas de árboles. Su distribución está estrechamente relacionada con las características físicas y químicas del ambiente y por esta razón son consideradas como valiosos indicadores biológicos.

La utilización de las diatomeas como indicadores necesita de un buen conocimiento de su biología, su ecología y su clasificación, lo que hace necesaria la participación de un especialista ya que son muchas las especies que pueden ser halladas.

1.2 Las diatomeas y el diagnóstico de muerte por sumersión

El diagnóstico de muerte por sumersión (o ahogamiento húmedo) se basa esencialmente en datos etiológicos, anatómicos y biológicos relacionados con las modificaciones que resultan del ingreso de líquidos en el torrente circulatorio [19].

Las comprobaciones habituales, aún en un cadáver reciente, tienen poco valor demostrativo y muchas veces la cantidad de líquido en los pulmones es escasa por la absorción. En cadáveres con un grado de descomposición avanzada estos signos pueden faltar y en estos casos, entonces, las observaciones anátomo-patológicas y físico-químicas son de interés limitado.

Ya en el siglo XVI existía la preocupación por identificar casos de muerte por ahogamiento a pesar de que, en ese tiempo, se sabía muy poco sobre los pulmones y su funcionamiento. Según Ludes & Coste [11], recién a principios del siglo XX se propuso como prueba de ahogamiento la búsqueda de algas silíceas (diatomeas) en los pulmones de cadáveres dado que estas algas poseen una cubierta silícea que evita su degradación.

Las diatomeas son inhaladas al mismo tiempo que el agua de las primeras fases del ahogamiento, inmediatamente luego de la hiperventilación reactiva e igualmente luego de los movimientos inspiratorios de la fase de agonía. Las valvas y sus fragmentos penetran en la circulación general a través de rupturas en las paredes alveolares del pulmón y, de allí, a los diversos órganos, notablemente el hígado, los riñones, el cerebro y también la médula ósea, donde pueden ser re-encontradas aunque el cuerpo se encuentre en avanzado estado de descomposición y no puedan aplicarse las otras técnicas de investigación [11][15][19][20].

Si bien algunos autores (Geissler & Gerloff [7] y Foged [6]) no aceptan este método por haberse hallado diatomeas en órganos de cadáveres de personas no fallecidas por ahogamiento (que podrían haber sido inhaladas del aire o ingeridas), otros (Auer [1], Ludes & Coste [11]) lo apoyan firmemente y señalan que dichos hallazgos pueden deberse a contaminaciones externas durante la extracción (por ejemplo en agua en la mesa de autopsia o las ropas de la víctima) así como de los reactivos y material de vidrio utilizados en el posterior tratamiento y conservación de los tejidos.

La aplicación del “test de diatomeas” [13], que es un examen basado en la búsqueda de diatomeas de los órganos vitales de la persona fallecida [18], es en la actualidad una práctica de rutina para el diagnóstico de muerte por sumersión en varios países de Europa [3][9][12], Asia [10][18] y América del Norte [8][14]. En los laboratorios forenses de Argentina, por ejemplo, el diagnóstico de muerte por aspiración de agua (ahogamiento verdadero) se basa únicamente en la búsqueda de “geoplancton” (partículas minerales birrefringentes) en corazón y médula ósea sin atender la cantidad de “falsos positivos” [2][16] que surgen de aplicar este método [21]. Estos últimos autores analizaron los resultados de las autopsias de más de 100 cadáveres de personas fallecidas por distintas causas y probaron la presencia de tales partículas birrefringentes de diversos tamaños en la médula ósea esternal en casos donde el deceso no fue causado por sumersión. En consecuencia, propusieron que se considerara como práctica de rutina la búsqueda de diatomeas en los tejidos y, asimismo, valorizaron la importancia de buscar la concordancia entre las diatomeas que viven en el sitio del hallazgo del cuerpo con las descubiertas en los órganos de la víctima.

Es por ello que el conocimiento de la distribución geográfica y la ecología de las diatomeas son datos de particular interés en este tipo de análisis.

La mayor certeza en el diagnóstico puede obtenerse si se tiene en cuenta:

- una técnica rigurosa que evite contaminaciones externas,
- la definición de un número mínimo de diatomeas a partir del cual el análisis pueda considerarse como positivo,
- la comparación de los géneros y especies de diatomeas descubiertas en los órganos de la víctima y los del agua donde se los descubrió o los del lugar de inmersión (si es que este se conoce).

Para la interpretación de los resultados se deben tener en cuenta las circunstancias del deceso, las características del lugar donde fue descubierto el cuerpo, la demora entre el hallazgo y la desaparición y, además, la flora acuática del lugar.

Conocer las diatomeas presentes en las muestras de agua procedentes del sitio del hallazgo del cadáver y reconocer sus preferencias ecológicas permite establecer, por una parte, las condiciones que prevalecían en el ambiente del que proceden y, por otra parte, realizar la comparación con las algas halladas en los tejidos analizados.

El Laboratorio de Diatomeas Continentales (FCEyN-UBA, Argentina) es uno de los pocos que son requeridos con cierta regularidad para intervenir en peritajes y, desde 1997 hasta el presente, se han realizado alrededor de 70 peritajes, informando sobre la presencia/ausencia de diatomeas en tejidos cadavéricos y en muestras de agua obtenidas en el lugar del hallazgo de los cuerpos. Pese a esto, este tipo de diagnóstico todavía no constituye una práctica de rutina para los cuerpos médicos forenses.

En Chile, un equipo formado por investigadores de la Universidad Católica del Norte (Antofagasta) y de la FCEyN-UBA obtuvo el financiamiento para llevar adelante un proyecto de investigación sobre el tema [4]. En este proyecto pusimos a prueba distintos métodos para el tratamiento de las muestras, evaluando sus ventajas y desventajas. Algunos de estos procedimientos permiten recuperar no solo valvas (Figs 1A, G, H) y fragmentos de valvas de diatomeas (Figs 1B, C, Db-c, F) sino también de otras algas, tanto con estructuras silíceas, como por ejemplo crisofíceas (Fig. 1E) como orgánicas resistentes (dinoflagelados, desmidiáceas, etc.) y por ello se propuso reemplazar el nombre de “test de diatomeas” por el de “test de fitoplancton”. Este nombre posiblemente resulta tan restrictivo como el de “test de diatomeas” y podría ser reemplazado, por ejemplo por el de “test de microalgas”, ya que la muerte por sumersión puede ocurrir en ambientes tanto profundos como muy someros y que por lo tanto es posible recuperar del cadáver no solo restos de microorganismos procedentes del plancton sino también de otros microhábitats.

2 Metodología

2.1 En los laboratorios forenses

2.1.1. Preparación del material

a) Preparación de agua destilada libre de diatomeas (ALD)

Como el perito debe tener la seguridad de que si encuentra diatomeas en las muestras que va a analizar, estas solo hayan ingresado al cuerpo como consecuencia del fenómeno de sumersión, todo el material que se use para este test deberá ser lavado previamente con agua destilada que no contenga diatomeas (ALD).

Para esto, lo recomendable es filtrar agua destilada a través de un filtro de fibra de vidrio o teflón con tamaño de poro no mayor de 0,45 μm . No conviene utilizar papel de filtro porque puede contener diatomeas procedentes de la pasta de papel.

Si no se pudiera realizar el filtrado, entonces como último recurso se puede colocar el agua destilada en un recipiente previamente lavado y enjuagado 3 veces con agua destilada. Se tapa el recipiente y se lo deja reposar 24 h. Después de ese tiempo, se puede utilizar el agua de la parte superior del recipiente, cuidando de no agitarlo. Esto es porque como las diatomeas son más pesadas que el agua, caerán rápidamente por su peso y en aproximadamente 2-3 h se habrán depositado en el fondo del recipiente.

b) Lavado del material

Las herramientas que se destinen al diagnóstico de muerte por sumersión no deben ser usadas para otros fines porque pueden contaminarse.

Todas las herramientas y materiales no descartables que se vayan a utilizar deberán ser dejados en remojo al menos 24 h en una solución preparada, con 100 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 900 mL de agua destilada a temperatura de alrededor de 80-90° C.

Luego de transcurrido ese tiempo, se enjuagará el material con agua destilada 3 o 4 veces y finalmente se le darán 2 enjuagues con ALD.

Todo el material puede dejarse secar a temperatura ambiente en un lugar protegido del polvo. Nunca se usará papel para el secado. Si fuera necesario realizar un secado rápido, puede usarse una estufa (salvo, obviamente, si el material es plástico).

Una vez seco, el material debe guardarse protegido del polvo ambiental. Se puede usar papel de aluminio para envolverlo.

2.1.2. Obtención de las muestras

a) Tejidos cadavéricos

Todas las muestras de tejidos, una vez colocadas en el recipiente adecuado, deberán conservarse refrigeradas hasta su envío al perito correspondiente.

Médula ósea

Se deberá lavar con ALD el hueso seleccionado para el análisis (esternón, fémur, húmero) antes de abrirlo con cuidado, con el fin de no contaminar el interior y de extraer la médula con una herramienta adecuada (previamente lavada como se indicó en el apartado anterior).

La muestra será colocada en un frasco rotulado que haya sido previamente pesado. Luego, el frasco deberá ser pesado nuevamente a fin de calcular el peso de muestra obtenido. Este dato deberá figurar en el recipiente que se envíe al perito.

Sangre

Lo ideal es realizar un lavado de la cavidad cardíaca con ADL. Para esto se deberán utilizar jeringas o pipetas preferentemente descartables. Se debe rotular el envase, registrando el volumen de líquido extraído del cuerpo.

Si se le adiciona algún anticoagulante a la muestra de sangre, deberá controlarse que esté también libre de diatomeas. Para verificarlo, se pueden centrifugar unos 10 ml del reactivo a utilizar, descartar el sobrenadante y observar el residuo bajo microscopio, con un aumento de, al menos, 400X (por ejemplo en un caso analizado en nuestro laboratorio, verificamos la presencia de dinoflagelados en una muestra de EDTA usado como anticoagulante).

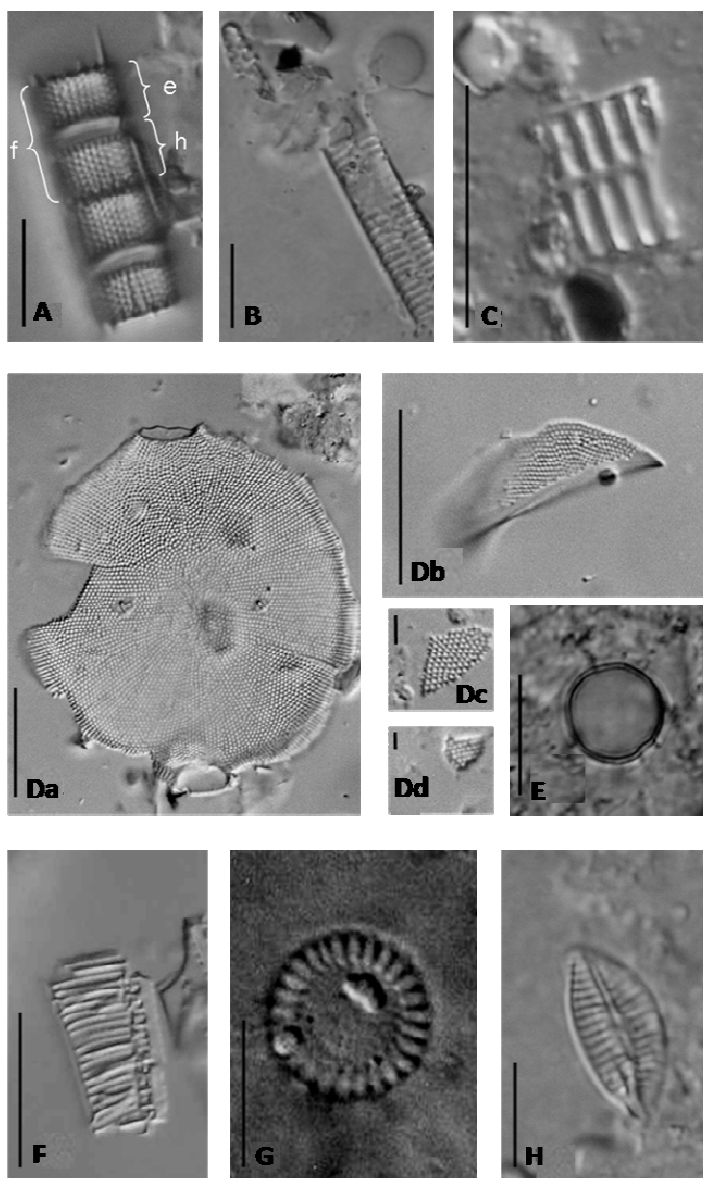


Figura 1: A-H. Diatomeas recuperadas en el curso de distintos peritajes realizados en el Laboratorio de Diatomeas Continentales (FCEyN-UBA). **A-C, Dc-d, E-H.** Material procedente de tejidos cadavéricos. **A.** Cadena de 2 células de *Aulacoseira granulata* en vista cingular (f: frústulo; e: epiteca; h: hipoteca). **B-C.** Fragmentos de valvas de *Ulnaria ulna*. **Da-d.** *Pleurosira laevis*, a: valva rota, b-d: fragmentos del cingulo (a-b: muestra de agua del sitio de hallazgo del cadáver; c: muestra de sangre; d: muestra de médula ósea). **E.** Estatospora (=cisto) de un alga crisofícea. **F:**

Fragmento de una valva de *Nitzschia* sp. **G:** Valva de *Cyclotella meneghiniana*. **H.** Valva de *Encyonema* sp. Escala: A-C, Da-b, F-H:10 μm ; Dc-d: 1 μm .

Otros órganos (hígado, riñón, pulmón, etc.)

El órgano a analizar deberá lavarse una vez extraído, con ALD. Con una herramienta adecuada, libre de diatomeas, se cortará una porción de tejido de, aproximadamente, 2 cm^3 y se colocará en un recipiente limpio, previamente pesado y rotulado.

b) Muestras del lugar del hecho

A fin de comparar las diatomeas recuperadas de las muestras de tejido cadavérico con las del sitio donde puede haber ocurrido la muerte por sumersión, se deberán obtener muestras del sitio del hallazgo del cuerpo.

Es necesario que la muestra se tome en el mismo momento en que se recupera el cuerpo de la víctima, ya que los ambientes acuáticos sufren cambios estacionales y las algas que predominan en verano, por ejemplo, pueden no estar presentes un par de meses más tarde.

Muestras de agua

Deberá utilizarse un envase limpio de 1 o 2 L de capacidad el que, cuidando de no remover el fondo del cuerpo de agua, deberá ser enjuagado 2 veces y luego ser llenado con ese mismo agua.

Lo ideal y dependiendo de las posibilidades, sería extraer, de un sitio no muy próximo a la orilla, un cubo o balde de agua de unos 5 o 10 L de capacidad y usar una parte para enjuagar el envase y el resto para el análisis. De esa manera se evita la remoción de los sedimentos del fondo que agregarían elementos extraños a la muestra que se va a analizar.

Para preservar esta muestra deberán agregársele, aproximadamente, 40 ml de formol por cada litro de muestra.

Deberá rotularse el frasco con la fecha y el nombre del sitio del que se obtuvo la muestra.

Muestras de sedimento

En algunos casos es adecuado analizar también el contenido de diatomeas en el barro de la orilla de un cuerpo de agua. Esto puede servir para relacionarlo con lo hallado, por ejemplo en las suelas de los zapatos o en las ruedas o la cajuela o baúl del automóvil de un sospechoso.

En este caso, se tomará una porción del barro en cuestión con espátula o cuchara previamente lavadas con ALD y se colocará en un frasco de boca ancha (también tratado como el resto del material).

Para preservar esta muestra también deberán agregársele formol (aproximadamente 20-30 mL) y agitar para que se mezcle.

El envase deberá rotularse indicando el tipo de muestra coleccionada (agua, sedimento, rocas, etc.), la fecha y el nombre del sitio del que se obtuvo la muestra.

2.1.3. Envío de las muestras

Las muestras deberán conservarse en sus recipientes, bien cerrados y convenientemente rotulados hasta que sean enviados al perito que realizará los análisis.

Para su transporte se recomienda cuidar el embalaje para minimizar la posibilidad de pérdidas de material.

Antes de su envío deberá controlarse que las botellas conteniendo agua del lugar del hallazgo del cuerpo estén perfectamente cerradas y que no haya filtraciones del líquido.

2.2 Análisis diatomológico

Las muestras, dependiendo de su naturaleza, se procesarán para la eliminación de todo resto de materia orgánica, especialmente el tejido graso de la médula ósea, siguiendo metodologías ya estandarizadas, como por ejemplo las descritas por Ludes & Coste [11] y por Díaz-Palma *et al.* [4].

Una vez limpio el material, se confeccionarán preparaciones permanentes utilizando algún medio de montaje con un índice de refracción tal que permita la visualización de los caracteres de las valvas y sus fragmentos, para su identificación y cuantificación.

3 Resultados

Una vez realizado el análisis microscópico, con los listados de las especies identificadas, tanto en las muestras de tejidos cadavéricos como de las obtenidas en el lugar del hallazgo de la víctima se confeccionan tablas que facilitan la interpretación de los resultados obtenidos (Tabla 1).

El perito solo emite un informe en el que consigna sus resultados; el que diagnostica si el deceso se produjo o no por sumersión es el médico forense. En líneas generales, para considerar el test como positivo, se deben recuperar más de 5 valvas por cada 10 g de muestra de tejido cadavérico.

En la mayoría de los casos de autopsias de presuntos ahogados, se espera encontrar en los tejidos cadavéricos pocos representantes (ya sean valvas completas o fragmentos) de alguno/s de los taxones identificados en las muestras procedentes del sitio del hallazgo del cuerpo. Si este no es el caso, la explicación más lógica es que el deceso no se produjo en ese lugar y, en ese caso, debería hacerse un relevamiento de los cuerpos de agua más cercanos para tratar de encontrar coincidencias.

Tabla 1: Listado de las especies de diatomeas identificadas en las distintas muestras analizadas en relación con una presunta muerte por sumersión en Argentina. Los signos + indican el hallazgo de valvas y fragmentos y su mayor o menor frecuencia; fragm.: se hallaron solo fragmentos de valvas.

Taxón	Muestras procedentes del lugar del hallazgo del cadáver			Muestras de tejidos	
	Sedimentos de fondo	Agua de fondo	Agua de superficie	Lavado de cavidad cardíaca	Médula ósea esternal
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	+	+++	+++		
<i>Amphora copulata</i>					
<i>Amphora veneta</i>	++++	+++	+++	++	+++
<i>Anomoeoneis sphaerophora</i>			+		
<i>Campylodiscus clypeus</i>	fragm		+		
<i>Chaetoceros muellerii</i> (valvas)	++	+++	+		+
<i>Chaetoceros muellerii</i> (esporas)	+++	+++	+		
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>euglypta</i>	+	+			
<i>Craticula ambigua</i>	+				
<i>Craticula cuspidata</i>		+	+		
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Encyonopsis microcephalum</i>	fragm	+			
<i>Denticula kuetzingii</i>	+++	+++	++		+
<i>Diademsis contenta</i>	+				
<i>Entomoneis alata</i>	fragm	+++	+++	+++	+++
<i>Entomoneis paludosa</i>	fragm				
<i>Fragilaria capucina</i>	+	+	++		
<i>Gomphonema gracile</i>	+	+	+		
<i>Gomphonema parvulum</i>			+		
<i>Gyrosigma spencerii</i>		fragm	+		
<i>Luticola cohnii</i>	+				
<i>Navicula gregaria</i>		+	+		

<i>Navicula peregrina</i>		+		
<i>Navicula veneta</i>	+		+	
<i>Navicula</i> sp.				fragm
<i>Nitzschia amphibia</i>	+			
<i>Nitzschia capitellata</i>	+			
<i>Nitzschia constricta</i>	fragm	+		
<i>Nitzschia frustulum</i>	+		+	
<i>Nitzschia microcephala</i>	++			
<i>Nitzschia palea</i>	++	+++	+	fragm
<i>Nitzschia sigma</i>			+	
<i>Nitzschia rautenbachiae</i>	+		+	
<i>Nitzschia reversa</i>		+	+	
<i>Nitzschia</i> sp.	+			
<i>Pleurosigma</i> sp.	+			
<i>Pseudostaurosira subsalina</i>	+			
<i>Sellaphora pupula</i>	+			
<i>Surirella</i> sp.				
<i>Tabularia affinis</i>		+	+	
<i>Ulnaria ulna</i>	++	+		

4 Discusión y conclusiones

Para que el test de diatomeas sea una herramienta confiable, debe ser realizado por un profesional entrenado en la taxonomía de este grupo de algas. Debe ser capaz de reconocer no solo las especies por sus valvas completas sino también por sus fragmentos (Figs 1Da-d). La aplicación del “test de diatomeas” es una práctica de rutina en varios países de Europa, Asia y América del Norte para el diagnóstico de muerte por sumersión pero esto no ocurre en Sudamérica debido probablemente a la poca difusión que se le ha dado a esta práctica y que también es consecuencia directa de la escasez de especialistas. El prejuicio de que el trabajo que realiza el taxónomo es “como coleccionar estampillas” [5] no es nuevo y ha desvalorizado enormemente esta tarea. Expresiones poco felices como esa son el reflejo de las ideas que prevalecieron sobre todo en la segunda mitad del siglo pasado y que tuvieron como consecuencia que en todo el mundo se produjera lo que ahora se denomina “impedimento taxonómico”. Desde ese entonces se ha visto una reducción drástica del financiamiento otorgado a proyectos con base taxonómica siguiendo “modas” que desvalorizaban a esta disciplina y así se ha llegado a la casi “extinción” de expertos en muchos de los grupos de organismos que pueblan y poblaron nuestro planeta y de esto no escaparon las diatomeas.

La toma de conciencia a nivel mundial de esta situación llevó a la creación de la Convention on Biological Diversity, con el apoyo de las Naciones Unidas. En el marco de esta convención mundial, se planteó la denominada Iniciativa Mundial sobre Taxonomía, que en Argentina, por ejemplo, ha recibido el apoyo de la Secretaría de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. De acuerdo con lo publicado oportunamente por esa Secretaría (<http://www.ambiente.gov.ar/?idarticulo=1033>) se “intenta reducir los vacíos en nuestro conocimiento de los grupos taxonómicos, la escasez de taxónomos y curadores y el impacto que estas deficiencias tienen en nuestra habilidad de conservar, utilizar y compartir los beneficios de nuestra diversidad biológica”.

Es de esperar que como beneficio secundario del éxito de esta iniciativa, también se puedan formar más ficólogos que aporten su experticia a la Biología Forense y a incrementar la interacción con las otras ciencias forenses.

Referencias

- [1] Auer, A. 1991. *Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning*. American Journal of Forensic Medicine & Pathology 12: 213-218.
- [2] Bortolotti, F.; Del Balzo, G.; Calza, R.; Valerio, F. & Tagliaro, F., 2011. *Testing the specificity of the diatom test: search for false-positives*. Medicine, Science and the Law 51: S7-S10.
- [3] Delabarde, T.; Keyser, C.; Tracqui, A.; Charabidze, D. & Ludes, B. 2013. *The potential of forensic analysis on human bones found in riverine environment*. Forensic Science International 228: e1-e5.
- [4] Díaz-Palma, P.A.; Alucema A.; Hayashida, G. & Maidana, N.I. 2009. *Development and standardization of a microalgae test for determining deaths by drowning*. Forensic Science International 184: 37-41.
- [5] Draghi, C. 2009. *Experiencia de investigación paleontológica. 32 meses en la Antártida*. Exactamente 44: 21-23.
- [6] Foged, N. 1983. *Diatoms and drowning—once more*. Forensic Science International 21: 153-9.
- [7] Geissler, U. & Gerloff, J. 1966. *Das Vorkommen von Diatomeen in menschlichen Organen und in der Luft*. Nova Hedwigia, 10: 565-77.
- [8] Gruspier, K.L. & Pollanen, M.S. 2000. *Limbs found in water: investigation using anthropological analysis and the diatom test*. Forensic Science International 112: 1-9.
- [9] Horton, B.P.; Boreham, H. & Hillier, C. 2006. *The development and application of a diatom-based quantitative reconstruction technique in forensic science*. Journal of Forensic Sciences 51: 643-650.

- [10] Hu, S.; Liu, C.; Wen, J.; Dai, W.; Wang, S.; Su, H. & Zhao, J. 2013. *Detection of diatoms in water and tissues by combination of microwave digestion, vacuum filtration and scanning electron microscopy*. Forensic Science International 226: e48-e51.
- [11] Ludes, B. & Coste, M. 1996. *Diatomées et Médecine légale*. Ed. Médicales Internationales. Paris. 255 pp.
- [12] Ludes, B.; Coste, M.; North, N.; Doray, S.; Tracqui, A. & Kintz, P. 1999. *Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning*, International Journal of Legal Medicine 112: 163-166.
- [13] Pollanen, M.S. 1994. *Forensic diatomology and drowning*. Elsevier, Amsterdam. 159 pp.
- [14] Pollanen, M.S.; Cheung, C. & Chiasson, D.A. 1997. The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: a retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada. Journal of Forensic Sciences 42: 281-285.
- [15] Rennella, A. 2004. *Muerte por sumersión: en busca de un diagnóstico*. Cuadernos de Medicina Forense 3: 13-19.
- [16] Romero Palanco, J.L. 2007. *Muertes por sumersión. Revisión y actualización de un tema clásico de la medicina forense. Deaths by Drowning. A classic topic in Forensic Medicine revisited*. Cuadernos de Medicina Forense 13: 99-130.
- [17] Round, F.E.; Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. *The Diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge. 749 pp.
- [18] Singh, R.; Deepa, M. & Kaur, R. 2013. *Diatomological mapping of water bodies - A future perspective*. Journal of Forensic and Legal Medicine 20: 622-625.
- [19] Tabbara, W. & Dérobert, L. 1962. *Le diagnostic médico-légal de la submersion vitale par la recherche des diatomées dans la moelle osseuse*. Annales de Médecine Légale 42: 374-381.
- [20] Thomas, F.; Van Hecke, W. & Timperman, J. 1962. *Diagnostic médico-legal de la mort par submersion par la mise en évidence de diatomées dans la moelle des os longs*. Annales de Médecine Légale 42: 369-373.
- [21] Trezza, F.C.; Ravioli, J.A. & Navari, C.A. 1996. *Análisis de marcadores biológicos de sumersión*. La Prensa Médica Argentina 83: 337-343.